



胃肠肿瘤患者外周血 PCDH17mRNA 定量检测的临床意义

曾红波, 黄 波, 李兵峰, 高风华, 刘庆华, 陈 凯, 杨文伦 (天门市第二人民医院外科, 湖北天门 431700)

摘要: **目的** 分析原钙黏素 17 (PCDH17) mRNA 在胃肠肿瘤患者外周血中表达的临床价值。**方法** 对 48 例胃肠肿瘤患者分别采用荧光定量 PCR 方法检测其外周血原钙黏素 17 (PCDH17) mRNA, 采用免疫组化方法检测其肿瘤组织的 PCDH17 蛋白。**结果** 胃肠组织中 PCDH17 蛋白阳性表达率为 58.57%, 外周血原钙黏素 17 阳性率为 61.81%。治疗前外周血原钙黏素 17mRNA、治疗前、后 PCDH17mRNA 含量差值的含量在不同性别、年龄、治疗组及病理类型间差异无统计学意义。然而在有淋巴结、远处转移及最大肿瘤患者直径组差异有统计学意义。治疗前、后 PCDH17mRNA 含量差异的不同疗效无统计学意义。**结论** 胃肠肿瘤患者外周血 PCDH17mRNA 监测可以代替瘤组织 PCDH17 蛋白的监测。

关键词: 胃肠肿瘤 外周血 定量检测 临床意义

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2016) 08-005-03

The clinical significance of quantitative detection to peripheral blood PCDH17mRNA in patients with Gastrointestinal cancer

Zeng Hongbo, Huang Bo, Li Bin Feng, Gao Fenghua, Liu Qin hua, Chen Kai, Yang Wen lun (Surgical Department, the NO.2 People's Hospital of Tianmen, Tianmen, Hubei, 431700, China)

Abstract: **Objective** To analyze the original calcium sticky, 17 (PCDH17) mRNA expression in peripheral blood of patients with gastrointestinal tumor clinical value. **Methods** 48 cases of gastrointestinal cancer patients respectively using fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) to detect the peripheral blood of the original calcium sticky 17 (PCDH17) mRNA, using immunohistochemical **Method** To detect the tumor tissue PCDH17 protein. **Results** Gastrointestinal tissues PCDH17 protein positive expression rate is 58.57%, peripheral blood the original calcium sticky 17 positive rate was 61.81%. Treatment of peripheral blood before the original calcium sticky 17mRNA, before and after treatment PCDH17mRNA content difference of the content in different gender, age, there was no statistically significant difference between the treatment group and pathological types. However, in the presence of lymph node and distant metastasis and maximum diameter of tumor patients group difference was statistically significant. Before and after treatment PCDH17mRNA content difference of different curative effect is not significant. **Conclusion** Gastrointestinal tumor patients peripheral blood PCDH17mRNA monitoring can be instead of the tumor tissue protein PCDH17 monitoring.

Key words: Gastrointestinal tumor peripheral blood the quantitative detection clinical significance

当今国际上, 胃肠道肿瘤在当今机体肿瘤性疾病中是最常见当然也是最主要的常常引起患者死亡的肿瘤疾病之一, 其恶性程度高尤其是粘液性胃肠道肿瘤^[1-3]。长期以来, 科学家们一直认为肿瘤抑癌基因的表现遗传调控失调是肿瘤发生与发展的重要机制。原钙粘蛋白 17 (PCDH17) 作为钙粘蛋白超家族成员的一个分子, 是钙粘蛋白超家族中最核心的成员之一。PCDH17 具有转录翻译成蛋白质从而抑制肿瘤的发生、发展, 是一种肿瘤抑癌基因, 凡是在胃肠道肿瘤患者其表达出现基因沉默或是活性降低不能发挥其抑癌效应^[4-6]。PCDH17 基因被导入肿瘤细胞后, PCDH17 呈现较强的抗增殖效应, 并能促进肿瘤细胞的程序性死亡和以及有利于肿瘤细胞自噬的发生^[7-9]。本文研究胃肠道肿瘤患者外周血和胃肠肿瘤组织中的表达情况来指导临床血检验对胃肠道肿瘤的早期诊断, 现将相关数据汇报如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

入选 2009 年 1 月至 2013 年 12 月间入住我院肿瘤分院普外科及内科收治的经病理学或是细胞证实为胃肠道肿瘤共 45 例, 分别进行 NP 方案、单纯手术 (根治性手术或是局灶切除术) 治疗, 见表 1。

1.2 试剂

抗原钙粘蛋白 17 鼠抗人单克隆抗体 (武汉大学生命科学院提供); SABC 试剂盒即用型 (武汉博士德生物技术有限公司); Trizol (日本冈山 Invitrogen 生物公司), RT-PCR 试剂盒、定量 PCR 试剂盒 (上海生物工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 外周血 PCDH17 监测: 取肘前静脉血 2ml 分离外周血中有核细胞, 仔细阅读 Trizol 说明书来提取 RNA, 并同时电泳 RNA 和吸光

度测定, 选取纯度可靠的 RNA 进行下一步试验。

表 1: 45 例胃肠道肿瘤患者的一般资料

Table 1 The general data of 45 cases of patients with gastrointestinal tumor

		NP	手术	合计
中位年龄 (岁)		62.41	54.85	59.4
例数	男	30	24	24
	女	15	21	21
病理	鳞癌	13	18	26
	腺癌	22	27	19
分期	I	0	12	12
	II	0	8	8
	III	12	16	18
	IV	23	9	7

1.3.2 RT-PCR 反应步骤: 反转录反应 加 1 μl 500 μg/ml oligo (dT)15 primer, 涡旋混合, 简单离心。在 65 °C 加热混合物 10 分钟, 然后室温 10 分钟, 再分别加入下列试剂: 5× 第一链缓冲液 4 μl, 0.1 MDTT 2 μl, 10 mM dNTP 1 μl, 涡旋混合后, 简单离心, 37 °C 水浴 2min, 加 2 μl 200U/ml 的 M-MLV 反转录酶。轻缓混合, 37 °C 保温 1h。其总体积应为 20 μl。70 °C 加热 15min 终止反应, 然后加 20 μl, ddH₂O, cDNA 第一链可作为模板用于 PCR 扩增。若要去除与 cDNA 互补的 RNA, 可加 1 μl (2 units) 的 RNase H, 然后 37 °C 保温 20 min。PCR 扩增在冰上混合加入下列试剂: cDNA 第一链 1 μl, TaKaRa Ex Taq (5u/1 μl) 0.5 μl, 10×Ex Taq buffer 5 μl, dNTP mixture (2mM) 4 μl, Primer F (10 mM) 2 μl, Primer R (10 mM) 2 μl, ddH₂O 35.5 μl, PCR 反应程序: Step 1 94 °C 3min 1; Step 2 94 °C 1min, 60 °C 1min, 72 °C 1min, 30-40 Cycles; Step 3 72 °C 5 min 1; Step4 4 °C forever。根据 Gene Bank 提供人 PCDH17mRNA

作者简介: 曾红波, 男, 主治医师, 研究方向: 肿瘤疾病治疗与科研工作, E-mail: 16859600@qq.com。



序列, 利用 Olig7.0 软件进行引物设计。B-actin(100bp): 5-GCC TTA GAA TTT AAA CTA CA-3(F), 5-AAC TTC AAA CCC TGA CTA CA-3(R)。PCDH17(396 碱基对): 5-GCC TAA GAT ATA GGA CCC TTT G-3(F), 5-TCA TCC TGA GCC AGA TCC-3(R)。PCDH17(87 碱基对): 5-TCC GGG GCA GTT CGG-3(F), 5-CTA TTG TTA GTA GAG ATG CCG T-3(R)。

PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。选取在符合目的基因大小处有明显条带的标本进行下一步试验 (图 1)。

定量 PCR 过程: 每个标本作 3 个平行对照、1 个空白对照。采用 SYBER Green I 法, 反应体系: 上下游引物各 1 μ l; cDNA 2 μ l; premix12.5 μ l; 双蒸水 8.5 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 s, 57.1 $^{\circ}$ C, 15 s (退火), 72 $^{\circ}$ C, 10 s, 共 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 免疫组化检测肿瘤组织 PCDH17: 切片依次脱腊水化后灭活内源性过氧化物酶、热源修复、滴加一抗 4e 过夜、依次滴加试剂 A、B 孵育后 DAB 显色, 苏木素轻度复染, 梯度酒精脱水, 中性树脂封片。PBS 液代替一抗做空白对照。所有切片均采用双盲法由两位病理医生观察诊断, 结果不一致的切片, 由两人再次读片。PCDH17 阳性信号为胞浆内出现黄色至棕褐色颗粒状染色。采用染色细胞百分率乘以染色强度综合记分方式评估。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计处理, 独立样本 t 检验、person 检验, 计数资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 外周血检 PCDH17mRNA 情况

共 45 例胃肠道肿瘤患者治疗前、后的外周血标本, RNA 定性电泳结果显示 PCDH17mRNA 阳性病例 28 例, 阳性率 62.2%。以 B-actin (100 bp) 为内参, 目的基因的阈值循环值 (Ct) PB-actin 阈值循环值 (Ct) 作为观测值, 此比值与目的基因含量呈反比。这可以消除个体差异造成的目的基因含量不同。对所得比值经检验, 呈正态分布。治疗前外周血 PCDH17mRNA 的含量、治疗前、后 PCDH17mRNA 含量差值在不同性别、年龄、疗效、治疗组及病理类型间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而在有无淋巴结、远处转移及不同最大肿瘤直径组差异有统计学意义 ($P<0.05$), 有远处转移、淋巴结及最大肿瘤直径 <3 cm 其含量较无远处转移、淋巴结及最大肿瘤直径 ≥ 3 cm 者治疗前外周血 PCDH17mRNA 的含量高且治疗后 PCDH17mRNA 含量减少的程度低。进展组 (progressive disease, PD) 化疗后 PCDH17mRNA 量增加, 受益组 (CR: complete response+PR: partial response+MC: No change) 治疗后 PCDH17mRNA 量减少。二者差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2、3。

表 2: 胃肠肿瘤患者治疗前 PCDH17mRNA 及治疗后其量变与一般临床资料的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The quantitative change of PCDH17mRNA before treatment and after treatment in patients with gastrointestinal tumor compared with the general clinical data ($\bar{x} \pm s$)

一般情况	治疗前 PCDH17mRNA 的 Ct 值	P	治疗前、后 PCDH17mRNA 值变化	P
性别				
男	1.51 $\pm$ 0.03	0.312	-0.03 $\pm$ 0.012	0.386
女	1.63 $\pm$ 0.08		-0.105 $\pm$ 0.058	
年龄				
<55 岁	1.53 $\pm$ 0.06	0.627	-0.04 $\pm$ 0.01	0.513
≥ 55 岁	1.51 $\pm$ 0.07		-0.07 $\pm$ 0.03	

表 3: 胃肠肿瘤患者治疗前 PCDH17mRNA 及治疗后其量变与病理特征及疗效的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The quantitative change, pathological features and the curative effect of PCDH17mRNA before treatment and after treatment in patients with gastrointestinal tumor compared with the general clinical data ($\bar{x} \pm s$)

病理特征及疗效	治疗前 PCDH17mRNA 的 Ct 值	P	治疗前、后 PCDH17mRNA 值变化	P
病理				
腺癌	1.56 $\pm$ 0.48	0.598	-0.068 $\pm$ 0.04	0.251
鳞癌	1.55 $\pm$ 0.49		-0.069 $\pm$ 0.00	
最大肿瘤直径				
<3 cm	1.63 $\pm$ 0.03	0.036	-0.058 $\pm$ 0.048	0.036
≥ 3 cm	1.09 $\pm$ 0.04		-0.018 $\pm$ 0.047	
N				
有	1.29 $\pm$ 0.05	0.027	-0.08 $\pm$ 0.04	0.046
无	1.89 $\pm$ 0.05		-0.26 $\pm$ 0.02	
M				
有	1.36 $\pm$ 0.05	0.042	-0.06 $\pm$ 0.04	0.000
无	1.82 $\pm$ 0.06		-0.19 $\pm$ 0.02	
治疗方法				
手术组	1.62 $\pm$ 0.025	0.251	-0.05 $\pm$ 0.02	0.581
化疗组	1.51 $\pm$ 0.06		-0.03 $\pm$ 0.005	
疗效				
受益组	1.59 $\pm$ 0.04	0.469	-0.128 $\pm$ 0.03	0.021
进展组	1.49 $\pm$ 0.08		-0.048 $\pm$ 0.03	

2.2 胃肠组织肿瘤的检测

45 例肿瘤组织切片中发现有 26 例 PCDH17 蛋白表达为, 其阳性表达率为 58.57%。

2.3 外周血与肿瘤组织 PCDH17mRNA 表达的相关性

通过本次回顾研究检查术前血液当中 PCDH17mRNA 与术后胃肠肿瘤组织中 PCDH17 蛋白表达也就是染色指数成正太分布。行相关性统计学分析即 Person 检验发现两者呈正相关 ($P<0.05$)。

3 讨论

当前研究证实 PCDH17 在胃肠道组织中定量而稳定地翻译表达, 发现年龄、性别、病理组织学与 PCDH17 阳性表达率之间没有关联, 但与 TNM 分期关系密切, 阳性率越高预示着其分期愈晚^[10-12]。当然, 对胃肠道肿瘤组织这些指标检测, 有利于较准确而又快捷地对高发复发的患者进行筛选, 这对疾病的评估和预后以及指导治疗都有重要的参考价值。但是由于对不能很好地进行动态检测 PCDH17, 这样就无穷地对临床工作上肿瘤组织中 PCDH17 检测的实际应用的开展受到很大程度的限制。

笔者在本次研究中发现外周血患者治疗前外周血 PCDH17mRNA 含量高低和组织中 PCDH17 蛋白含量存在某种正相关即外周血 PCDH17mRNA 含量高那么组织中 PCDH17 表达就高。而 PCDH17mRNA 含量对不同年龄、治疗效果、性别及病理分型间差异的比较, 却无统计学意义, 然而与 TNM 分期在一定程度上存在联系, 也就是说阳性率越高那么分期越晚, 这和相关报道相互吻合, 外周血 PCDH17mRNA 的含量有可能与组织中 PCDH17 蛋白的含量等同或是相似那么外周血 PCDH17mRNA 的检测可以应用于临床来评估肿瘤的性质或是病变程度, 本次研究发现肿瘤患者治疗前后的 PCDH17mRNA 变化与疗效密切相关, 肿瘤患者接受治疗敏感者因此受益而血肿含量下降也意味着组织表达含量下降治疗显效, 反之则升高。那些肿瘤分期越晚肿瘤患者外周血 PCDH17mRNA 的水平与对接受化疗的敏感性直接关联, 这样通过外周血 PCDH17mRNA 的水平检测便于对治疗效果和预后进行正确地评判, 也有利于对其进行动态观察方便临床开展和操作。这是因为我们采用外周血离心分离有核细胞后, 通过免疫化学方法提取和纯化 PCDH17mRNA, 外周血有核细胞是肿瘤细胞脱落到血液当中而分离得到, 循环血管内皮细胞 CECs 及淋巴细胞 (主要包括成熟的 CECs 和部分骨髓来源的血管内皮前体细胞 (endothelial precursors, EPs) 等也存在于外周血液组织当中^[16-19]。

本研究发现治疗前、后外周血 PCDH17mRNA 差值, 在不同部位胃肠道肿瘤组织、肿瘤大小及转移情况方面外周血 PCDH17mRNA 差值存在明显差别: 特别是体积较大的肿瘤、存在淋巴结或 (和) 远处转移



的肿瘤患者,那么对于放化疗来降低PCDH17mRNA表达相对较为困难,那么治疗效果欠佳,也就是说肿瘤分期差的患者抗凋亡能力相对来说耐性较强,手术或化疗单一治疗或是联合可能对此种患者的治疗效果可能不是很乐观,我们力求从本研究的结果出发寻求更有效降低外周血PCDH17mRNA表达的治疗手段譬如肿瘤学上提到的靶向疗法,从而为肿瘤患者取得更好的疗效甚至在一定程度上抑制肿瘤的进一步发展或是病情的恶化。在今后的试验中,希望在PCDH17mRNA与长期生存率的关联研究报道深入开展,以便更好地指导临床和为深层次的研究奠定基础。

参考文献

- [1] Shepherd GM, Chen WR, Greer CA: Olfactory bulb. In The Synaptic Organization of the Brain. 5th edition. Edited by Shepherd GM. New York, Oxford University Press; 2004:165-216.
- [2] Buck LB: Olfactory receptors and odor coding in mammals. Nutr Rev 2004, 62:S184-8; discussion S224-41.
- [3] Imai T, Suzuki M, Sakano H: Odorant Receptor-Derived cAMP Signals Direct Axonal Targeting. Science 2006.
- [4] Feinstein P, Mombaerts P: A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. Cell 2004, 117:817-831.
- [5] Nedelec S, Dubacq C, Trembleau A: Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? J Neurocytol 2005, 34:49-64.
- [6] Graziadei PP, Monti Graziadei GA: Neuronal changes in the forebrain of mice following penetration by regenerating olfactory axons. J Comp Neurol 1986, 247:344-356.
- [7] Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, Meneses J, Pedersen R, Axel R, Rubenstein JL: An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons.
- [8] Poulogiannis G, Luo F, Arends MJ: RAS signalling in the colorectum in health and disease. Cell Commun Adhes. 2012;19:1-9.
- [9] Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus

irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J Clin Oncol. 2011;29:2011-9.

[10] Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, et al. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. Br J Cancer. 2011;104:1372-6.

[11] Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, et al. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: Which scoring system should we use? Hum Pathol. 2012;43:413-22.

[12] Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, et al. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: Which scoring system should we use? Hum Pathol. 2012;43:413-22.

[13] Satoh T, Bang YJ, Gotovkin EA, Hamamoto Y, Kang YK, Moiseyenko VM, et al. Quality of life in the trastuzumab for gastric cancer trial. Oncologist. 2014;19:712-9.

[14] Pazdur R. FDA Approval for Trastuzumab. National Cancer Institute. 2013. Mar 7, [Last accessed on 2014 Jul 12].

[15] Post-authorisation Summary of Positive Opinion for Herceptin. European Medicines Agency. 2009. Dec 17, [Last accessed on 2014 Jul 12]. Available from:

[16] Jørgensen JT. Role of human epidermal growth factor receptor 2 in gastric cancer: Biological and pharmacological aspects. World J Gastroenterol. 2014;20:4526-3

[17] García-Carbonero R, Pazo R, et al. A critical review of HER2-positive gastric cancer evaluation and treatment: From trastuzumab, and beyond. Cancer Lett. 2014;351:30-40.5.

[18] Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2012;366:109-19.

(上接第4页)

注:与其他失血量相比, $^{\circ}P<0.05$ 。

2.3 治疗效果分析

经治疗,70例患者中症状明显好转62例,行子宫次全切4例,行子宫全切3例,死亡1例。

3.讨论

在产科临床中引发的出血性休克现象,是指患者机体血容量出现急剧降低的休克情况,其可使患者在极短时间内血容量不断流失,导致患者机体循环血容量急剧下降而引发休克、衰竭,甚至是死亡。该症状临床症状多表现为心动过速、静脉压降低、外周阻力加大等,严重还可出现意识模糊、血压骤降、酸中毒及死亡^[3]。目前,临床上主要给予该症状患者止血、血容量补充、心脏功能改善、吸氧、酸中毒控制、感染预防等常规治疗,但治疗效果有限。因此,为减少对患者的机体伤害,确保患者生命安全,降低患者死亡率,还需要临床对该症状的发生原因作进一步的探索和分析,以为患者寻求更有效的治疗措施。

临床研究表明,出血性休克产生原因主要为胎盘因素、生殖道损伤、子宫局部因素及凝血功能障碍等,其中以子宫局部因素引发的出血性休克现象较多,其次为生殖道损伤^[4]。胎盘因素多与流产、引产等原因造成的宫腔感染或子宫内黏膜破损等相关,如胎盘剥离不当、胎盘置入及胎盘早剥等,此类原因造成的出血性休克现象较严重,需给予牵拉脐带、缩宫素及子宫按摩等相应治疗;生殖道损伤则是由生产

期间阴道及产道未得到有效保护、生产太快、宫缩幅度过大及巨大儿等原因造成,从而引发产妇产后出血,对此需要在产妇产过程中注意把控好生产速度、适当调节宫缩力度及保护好产妇产阴道、产道^[5]。

我院针对患者出血性休克发生原因,为其制定了相关治疗措施:首先全面分析了患者出血及休克的发生原因,并根据发生原因制定合理、有效的治疗方案;其次对患者出血量及休克发生率进行了充分评估,并及时建立静脉通道,给予其血容量补充;最后做好患者保暖、输氧等措施,并控制患者酸中毒现象。结果显示,70例患者中绝大部分患者病情好转,仅有1例死亡。由此说明,加强对产科出血性休克发生原因的临床研究,并针对其发生原因加以对症治疗,是治疗该病的关键所在,临床应积极加强这方面的研究。

参考文献

- [1] 杜娟.腹腔镜手术治疗出血性休克型异位妊娠的可行性[J].中国医药指南,2016,14(06):127-128.
- [2] 吴君梅,张有新,刘哈.产科出血性休克的主要因素及治疗体会[J].中国医学创新,2013,5(15):211-212.
- [3] 李健伟,付晓东,颜真淑等.分析产科出血性休克的临床原因及治疗措施[J].大家健康(下旬版),2013,7(01):109-110.
- [4] 康玉明.浅谈出血性休克患者的临床诊疗[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(25):39-41.
- [5] 罗胜英.1例双侧子宫动脉栓塞术治疗产后出血性休克的护理[J].护理实践与研究,2016,13(05):156-157.